Iranian Food Science and Technology
Research Journal
Vol. 16, No. 5, Dec- Jan 2021, p. 569-580

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۶، شماره ۵، آذر- دی ۱۳۹۹، ص. ۵۸۰-۵۶۹

مقاله علمی- پژوهشی

بهینه‌سازی استخراج و اصلاح ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین و فیبر باقلا توسط اولتراسوند و هیدرولیز آنزیمی

محیا اورجی[۱]- مزدک علیمی[۲]*- علی معتمدزادگان[۳]- شیرین شکوهی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۲۶

چکیده

در بین حبوبات مختلف، باقلا حاوی مقدار زیادی پروتئین، فیبر، ویتامین‌های گروه B و مواد معدنی است که می‌توان با هدف توسعه مواد غذایی نوین با مشخصات تغذیه‌ای بهبود یافته مورد استفاده قرار گیرد. در این پژوهش جهت بهینه‌سازی استخراج و اصلاح ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین و فیبر باقلا، از اولتراسوند و هیدرولیز آنزیمی استفاده شد. به‌طوری که پروتئین‌های باقلا تحت تاثیر اولتراسوند در قدرت‌های ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ وات و در طی مدت زمان‌های ۱۵، ۲۵ و ۳۵ دقیقه و آنزیم آلکالاز 2.4 LFG در دوزهای مصرفی ۰/۱۵، ۰/۳ و ۰/۴۵ درصد در مدت زمان‌های ۱۵، ۲۵ و ۳۵ دقیقه استخراج و تیمارها توسط نرم‌افزار دیزاین اکسپرت طراحی شدند. استخراج فیبر باقلا، تحت شرایط قلیایی از محلول ۰/۰۰۱۲، ۰/۰۱۲ و ۰/۱۲ درصد هیدروکسید سدیم تا رسیدن به pH ۱۲، ۱۱ و ۱۰ و آنزیم Termamy 2x جهت هیدرولیز آنزیمی استفاده شد. نتایج نشان داد، استفاده از اولتراسوند و هیدرولیز آنزیمی تاثیر مثبتی در حلالیت، ظرفیت جذب روغن و میزان خاصیت امولسیون‌کنندگی نمونه‌های پروتئین باقلا داشت. همچنین پتانسیل زتا تمام تیمارها منفی بود، که نشان می‌دهد محلول تیمارهای پروتئین باقلا حاوی آمینواسیدهایی با بار منفی بیشتری نسبت به اسیدهای آمینه با بار مثبت است. در بین نمونه‌های فیبر باقلا، نمونه فیبر با pH ۱۰ بالاترین ظرفیت نگهداری آب و بالاترین سطح 'G که نشان‌دهنده وجود ویژگی جامد و الاستیکی بیشتری نسبت به دو نمونه دیگر است را نشان داد. همچنین در تمامی نمونه‌های فیبر، با افزایش سرعت برشی، ویسکوزیته کاهش یافت و یک رفتار رقیق‌شونده با برش یا سودوپلاستیک از خود نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: باقلا، استخراج، پروتئین، فیبر.

مقدمه

در سال‌های اخیر، دانه‌های حبوبات به دلیل غنی بودن از پروتئین، فیبرها، مواد معدنی و دیگر ترکیبات زیست فعال، با هدف توسعه مواد غذایی نوین با ویژگی‌های تغذیه‌ای بهبود یافته، مورد توجه قرار گرفته‌اند. شواهدی وجود دارد که مصرف حبوبات باعث کاهش خطر ابتلا به دیابت، بیماری‌های قلبی عروقی و برخی سرطان‌ها می‌شوند (Coda *et al.,* 2017). حبوبات، حدودا دو برابر محتوای پروتئینی بالاتری نسبت به غلات دارند و جایگزین خوبی برای گوشت می‌توانند باشند (Rosa *et al*., 2016). همچنین حبوبات سطوح فیبرهای نامحلول بالاتری در مقایسه با فیبرهای محلول دارند (Tiwari & Cummins, 2011).

باقلا (*Vicia faba*) متعلق به خانواده Fabaceae است (Amani *et al*., 2017) و به‌عنوان یک نوع لوبیا شناخته می‌شود، که از نظر ارزش تغذیه‌ای، به‌ویژه در کشورهای خاورمیانه، پر اهمیت است (Caliskanturk et al., 2017). باقلا یک گیاه یک ساله است که می‌توان در مناطق مختلف آب و هوایی کشت داد (Multari et al., 2015). باقلا حاوی ۲۱-۴۱٪ پروتئین،۵۱-۶۸٪ کربوهیدرات، ۵-۸/۵٪ برحسب ماده خشک فیبر، ویتامین‌های گروه B و مواد معدنی است (Hendawey and Younes, 2013). پروتئین این گیاه منبع غنی از اسیدآمینه لیزین می‌باشد و به‌غیر از تریپتوفان، متیونین و سیستین، پروتئین این گیاه از لحاظ سایر اسیدهای آمینه قابل رقابت با سویا می‌باشد (Quemener, 1988). این دانه همچنین دارای مقدار چربی و مواد ضدتغذیه‌ای (رافینوز و استاکیوز) کمتری در مقایسه با سویا می‌باشد (Zee *et al*., 1988). در سال‌های اخیر عملکرد پروتئین باقلا، به‌ویژه ایزوله پروتئین آن، برای کاربرد در محصولات غذایی، در مقیاس آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفته است و نشان‌دهنده قابلیت خوب

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری.
۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی.
۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.
۴- استادیار، پژوهشکده توسعه فناوری های شیمیایی، پلیمری و پتروشیمیایی، پژوهشگاه صنعت نفت.
(*- نویسنده مسئول: Email: ahooora_mazdak@yahoo.com)
DOI: 10.22067/ifstrj.v16i5.81629

آن در هیدراتاسیون، حلالیت ، امولسیون‌کنندگی، ویسکوزیته، تشکیل فوم و ژل می‌باشد (Giang *et al*., 2016). همچنین تحقیقات نشان داده که پروتئین باقلا دارای توانایی بیشتری در امولسیون‌کنندگی، کف‌کنندگی در مقایسه با آرد ماش، نخود و لوبیا بوده است (Khosravi *et al*., 2013). ویژگی‌های ساختاری و عملکردی مذکور در ایزوله‌ها و کنسانتره‌های پروتئین حبوبات از جمله باقلا به شدت تحت تاثیر روش‌های آماده‌سازی، استخراج و خشک کردن آن‌ها می‌باشد (Multari *et al*., 2015). انتخاب شرایط و تکنولوژی مناسب برای استخراج پروتئین می‌تواند در کارایی و ویژگی‌های تغذیه‌ای فرآورده نهایی موثر باشد. طیف گسترده‌ای از روش‌ها جهت استخراج و تجزیه پروتئین و پپتیدها مانند روش‌های اسیدی، قلیایی، آنزیمی وغیره وجود دارد که بر میزان استخراج و ویژگی های فیزیکی، شیمیایی و ساختاری آن‌ها مانند حلالیت، هیدروفوبیت، وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک و غیره تاثیرگذار هستند (Martinnez *et al*., 2013).

یکی از روش‌های بهبود استخراج و بهینه‌سازی ویژگی‌های پروتئین می‌تواند روش اولتراسوند و هیدرولیز کنترل شده آنزیمی باشد، Martínez و همکارانش (۲۰۱۸) گزارش کردند که اولتراسوند با شدت بالا باعث بهبود فعالیت سطحی، بهبود روند استخراج و جداسازی و تغییر ساختار پروتئین باقلا می‌شود. Jiang و همکارانش (۲۰۱۴) اثر اولتراسوند در فرکانس پایین (۲۰ کیلوهرتز) با استفاده از قدرت‌های مختلف در مدت زمان‌های مختلف بر ویژگی‌های عملکردی و ساختاری ایزوله پروتئین لوبیا سیاه را بررسی کردند که نتایج حاصل از طیف انتشار فلورسانس نشان داد که ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های لوبیا سیاه پس از تیمار با اولتراسونیک تغییر می‌کند به طوریکه در ۲۴ دقیقه اندازه ذرات به حداقل می‌رسد. همچنین Mu و همکارانش در سال ۲۰۱۰، گزارش دادند که استفاده از اولتراسوند می‌تواند به‌طور قابل توجهی راندمان استخراج پروتئین را افزایش و هزینه‌های کل تولید پروتئین سویا را کاهش دهد. برخی از مطالعات تغییر در ساختمان مولکولی پروتئین‌ها پس از تیمار با اولتراسوند با شدت بالا را بررسی کردند که تغییرات در گروه‌های سولفیدریل آزاد، اندازه ذرات، هیدروفوبیسیتی سطحی، تغییر ساختمان دوم پروتئین‌ها و تقویت فعالیت سطحی را در آنها ایجاد کرد و اکثر محققین تاثیر اولتراسوند با شدت بالا را بر خواص عملکردی پروتئین‌ها خصوصاً افزایش خواص هیدروفوبیک و کاهش اندازه ذرات تایید کرده‌اند (Mu *et al*., 2010).

Chen و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که اولتراسوند باعث تشدید هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها می‌شود و همچنین به‌طور قابل توجهی خواص رئولوژیکی، حلالیت، فعالیت سطحی و خصوصیات امولسیون‌کنندگی کنسانتره پروتئین سویا را و همچنین توانایی ژل شدن ایزوله پروتئین سویا را تقویت می‌نماید.

هیدرولیز پروتئین با استفاده از پروتئازها از منابع مختلف، فرآیندی است که برای افزایش هضم، کاهش عوامل آلرژیک، تقویت خصوصیات عملکردی و تولید پپتیدهای زیست فعال مورد مطالعه قرار گرفته است (Janser *et al.*, 2017). در این خصوص Nivala و همکاران (۲۰۱۷) به‌منظور بهبود پایداری کلوئیدی[1] و خواص کف‌کنندگی پروتئین‌های جو دوسر و باقلا، اقدام به تهیه ذرات کلوئیدی پروتئین‌ها با استفاده از آنزیم‌های Transglutaminase و Tyrosinase نمودند. خواص کف‌کنندگی و میزان حلالیت ایزوله پروتئین باقلا با افزایش میزان آنزیم‌ها، کاهش و اتصالات عرضی پروتئین باقلا افزایش یافت ولی بر پایداری کلوئیدی چندان موثر نبود.

حبوبات به‌طور کلی، مقدار بالایی از فیبر رژیمی را در رژیم غذایی تامین می‌کنند و به‌عنوان بخشی از درمان رژیم دیابت و در کاهش سطح کلسترول خون نقش دارند که نشان‌دهنده اهمیت درمانی آن‌ها است. تحقیقات نشان داده است که حبوبات سطوح فیبرهای نامحلول بالاتری در مقایسه با فیبر های محلول دارند (Tiwari & Cummins, 2011). در سال‌های اخیر به علت اهمیتی که فیبرهای رژیمی پیدا کرده‌اند روش‌های مختلفی برای تجزیه آن‌ها به‌وجود آمده است که بسیاری از این روش‌ها بسیار دقیق و ویژه بوده، برخی از آن‌ها دارای آنزیم‌هایی می‌باشند که با درجه خلوص بالا تهیه می‌شوند و به‌طور انتخابی سبب رها شدن الیگوساکاریدها و پلی‌ساکاریدهای محتوی فیبر رژیمی می‌شوند (Rocio *et al*., 2006). در این تحقیق امکان بهره‌گیری از روش فراصوت و هیدرولیز محدود آنزیمی در راستای افزایش راندمان استخراج و بهبود ویژگی‌های عملکردی پروتئین و فیبر باقلا مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد استفاده شده شامل، دانه باقلا رقم برکت تهیه شده از اصفهان (ایران)، آنزیم آلکالاز 2.4 L FG (*باسیلوس لیچنی فورمیس*، نوواتزیم، دانمارک)، آنزیم Termamly 2x (*باسیلوس فورمیس*، نوواتزیم، دانمارک)، سود (Merck, Darmstadt, Germany)، اسید کلریک (Merck, Darmstadt, Germany)، روغن ذرت (معمولی)، بافر فسفات ۰/۰۱ مولار (Merck, Darmstadt, Germany)، سولفات سدیم ۰/۱ درصد (Merck, Darmstadt, Germany)، اسید سیتریک (Jining foreign trading Co, Shandong, China) بوده است.

تمام خواص شیمیایی آرد دانه باقلا شامل، محتوای پروتئین، کربوهیدرات، چربی، خاکستر و فیبر با استفاده از روش‌های استاندارد تایید شده انجمن آمریکایی شیمیدانان غلات (AACC) اندازگیری شدند (AACC, 2000).

1.Colloidal Stability

روش تهیه و استخراج پروتئین باقلا

دانه‌های باقلا پس از خارج شدن از غلاف و پوسته، خرد، خشک و آسیاب شدند و برای یکنواختی ابعاد از مش ۶۰ عبور داده شد. ۱۰۰ گرم از آرد باقلا با نسبت ۱۰:۱ (w/v) در آب مقطر پراکنده شد. ترکیب آماده شده تحت تاثیر دستگاه اولتراسوند (UP400A، توسعه فناوری مافوق صوت، ایران) در قدرت‌های ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ W و در طی مدت زمان‌های ۱۵، ۲۵ و ۳۵ دقیقه قرار گرفت. سپس آنزیم آلکالاز 2.4 LFG به میزان ۰/۱۵، ۰/۳ و ۰/۴۵ درصد در مدت زمان‌های ۱۵، ۲۵ و ۳۵ دقیقه به ترکیب اضافه شد. pH ترکیب مورد نظر توسط، سود ۱ نرمال در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و به مدت ۱ ساعت در pH، ۹ تنظیم شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه سانتریفوژ (B4/100، بهسان، ایران) تحت نیروی گریز از مرکز با ۴۰۰۰ rpm قرار گرفت. در ادامه سوپرناتانت جمع آوری شد و توسط اسیدکلریک ۰/۱ نرمال به pH، ۴/۵ رسید و به مدت ۱ ساعت در این pH نگهداری شد و در نهایت با آب شستشو داده و توسط سود ۲ نرمال به pH نهایی ۷ رسید و توسط فریز درایر (GTFD-20، گزلین طب ایران، ایران) خشک شد و در دمای ۱۸- درجه نگهداری شد. (Nivala *et al.*, 2017 و Lu *et al.*, 2015). هر کدام از نمونه‌های پروتئین تیمار شده با سطوح مختلفی از قدرت و زمان اولتراسوند و میزان و زمان مصرف آنزیم در جدول ۱ کدگزاری شدند.

جدول ۱-کد گذاری نمونه‌های پروتئین استخراج شده از باقلا

فاکتورها/کد نمونه	توان اولتراسوند (W)	زمان سونیکیشن (min)	دوز آنزیم (%)	زمان اعمال آنزیم (min)
FBP1	۳۰۰	۳۵	۰/۱۵	۲۵
FBP2	۳۰۰	۲۵	۰/۴۵	۱۵
FBP3	۴۰۰	۳۵	۰/۳۰	۱۵
FBP4	۲۰۰	۱۵	۰/۱۵	۱۵
FBP5	۳۰۰	۱۵	۰/۳۰	۳۵
FBP6	۲۰۰	۲۵	۰/۳۰	۲۵
FBP7	۲۰۰	۳۵	۰/۴۵	۳۵
FBP8	۴۰۰	۲۵	۰/۱۵	۳۵
FBP9	۴۰۰	۱۵	۰/۴۵	۲۵

(پروتئین استخراج شده از باقلا = FBP=Faba Bean Protein)

آزمون حلالیت پروتئین

حلالیت پروتئین[1] باقلا با استفاده از روش Boye و همکاران (۲۰۱۰) اندازه گیری شد. اندیس حلالیت پروتئین در pHهای مختلف از نسبت ۲ به ۱۰ اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه ۱۰۰ mg از پروتئین به‌دست آمده در ۱۰ میلی‌لیتر از آب مخلوط و pH آن توسط محلول اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال و هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال در محدوده‌های مختلف تنظیم گردید. مخلوط برای ۳۰ دقیقه هم‌زده شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در سانتریفوژ (B4/100، بهسان، ایران) ۴۰۰۰ g قرار داده شد. میزان پروتئین شناور (آبگریز) بدین صورت که میزان پروتئین محلول را از کل پروتئین‌های نمونه ابتدایی محاسبه می‌کند. حلالیت به صورت درصد پروتئین موجود در مایع رویی به کل پروتئین در نمونه اولیه محاسبه شد و پروفایل حلالیت براساس میانگین حلالیت پروتئین نمونه‌های تکراری در pHهای مختلف به‌دست آمد.

اندازگیری ظرفیت جذب چربی در پروتئین

ظرفیت جذب چربی[2] در ۳ بار تکرار با استفاده از روش Lin و Humbert (۱۹۷۴) تعیین شد. حدود ۰/۵ گرم نمونه با ۳ میلی‌لیتر از روغن ذرت در داخل یک لوله مدرج به مدت ۱ دقیقه توسط شیکر مخلوط و سانتریفوژ شد، پس از سانتریفوژ (Labnet ،C 6، آمریکا) در ۴۰۰۰ g برای ۳۰ دقیقه، قسمت شناور جدا شد و توزین گردید با توجه به رابطه (۱) میزان FAC٪ تعیین شد.

FAC (%)= 100 × (وزن نمونه/ وزن روغن جذب شده توسط نمونه) (۱)

خاصیت امولسیون‌کنندگی[3] پروتئین

جهت تعیین خاصیت امولسیون‌کنندگی از روش اصلاح شده Boye و همکاران (۲۰۱۰) استفاده شد. ۱/۵ میلی‌لیتر روغن ذرت به ۴/۵ میلی‌لیتر از محلول پروتئین ۰/۵ درصد وزنی حجمی در بافر فسفات

1. Protein solubility
2. Fat absorption capacity
3. Emulsifying properties

۰/۰۱ مولار (pH:۷) اضافه شد. سپس مخلوط در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق برای مدت ۲ دقیقه با هموژنایزر اولتراتوراکس (T25 ، IKA، آلمان) هموژن گردید. ۲/۵ میلی‌لیتر از امولسیون جدا شده از قسمت زیرین در زمان‌های مختلف و با ۵۰ میلی‌لیتر از محلول سولفات سدیم رقیق گردید. سپس میزان رقت امولسیون تشکیل شده در یک طول موج ثابت ۵۰۰ نانومتر و به‌وسیله اسپکتروفتومتر مرئی UV (-uv 2100، unico، آمریکا) تعیین گردید. شاخص فعالیت امولسیفایری[1] (رابطه ۲) و شاخص پایداری امولسیفایری[2] (رابطه ۳) محاسبه شد.

Emulsifying activity index (EAI) (m^2/g) = [$2 \times 2.303 \times A_0/0.25 \times$ Protein concentration] (۲)

Emulsion stability index (ESI) (min)= [$A_0 \times \Delta t/\Delta A$] (۳)

A_0 میزان جذب در ۰ دقیقه، A_{10} میزان جذب در ۱۰ دقیقه، $\Delta A = A_0 - A_{10}$ و $\Delta t = 10$ min.

اندازگیری پتانسیل زتا پروتئین

پتانسیل زتا با آماده سازی محلول پروتئینی (۰/۰۵٪، W/W) در بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH ۷، با استفاده از پراکندگی نور لیزری در دستگاه Zetasizer (Nano-ZS, Malvern, UK) اندازه‌گیری شد (Tirgar *et al*., 2017).

روش تهیه و استخراج فیبر باقلا

تهیه، استخراج و اصلاح فیبر باقلا با استفاده از روش‌های اصلاح و تغییر یافته Feng و همکاران (۲۰۱۷) و اصلان‌زاده و همکاران (۱۳۹۰) انجام شد. فاز ته‌نشین شده پس از جداسازی سوپرناتانت از مرحله استخراج پروتئین با پراکسید هیدروژن تحت شرایط قلیایی تیمار گردید. در مرحله اول به منظور قلیایی نمودن محیط از محلول ۰/۰۰۱۲، ۰/۰۱۲ و ۰/۱۲ درصد هیدروکسید سدیم تا رسیدن به pH ۱۲، ۱۱ و ۱۰ استفاده شد. بدین ترتیب که نمونه باقی مانده از استخراج پروتئین باقلا با محلول آبی هیدروکسید سدیم مخلوط شده و سوسپانسیون حاصله توسط دستگاه مخلوط‌کن با درجه ۲ به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد هموژن گردید. به‌منظور جلوگیری از تبخیر محلول قلیایی و تغییر pH محیط، یک درب شیشه‌ای بر روی بشر حاوی ترکیبات قرار داده شد. سپس سوسپانسیون حاصله توسط سانتریفوژ (B4/100، بهسان، ایران) با دور ۴۰۰۰ g سانتریفوژ گردید و رسوب به‌دست آمده بعد از شستشو نهایی، صاف و در معرض مرحله رنگبری قرار گرفت. در این مرحله پراکسید هیدروژن به‌عنوان عامل رنگبر در سطح ۷٪ اضافه شد. عملیات همزدن در دمای ۶۰ درجه به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. جهت درمان و هیدرولیز آنزیمی، آنزیم Termamy 2x به محلول اضافه شد. ترکیبات جامد به‌دست آمده از سانتریفوژ، صاف شدند و در آون با دمای ۴۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید. نمونه های فیبر باقلا تیمار شده با سطوح مختلف pH در جدول ۲ کدگذاری شدند.

جدول۲- کدگذاری نمونه‌های فیبر استخراج شده از باقلا

کد نمونه فیبر	pH
FBF.10	۱۰
FBF.11	۱۱
FBF.12	۱۲

(فیبر استخراج شده از باقلا در pH ۱۰ =FBF.10، فیبر استخراج شده از باقلا در pH ۱۱ =FBF.11، فیبر استخراج شده از باقلا در pH ۱۲= FBF.12)

اندازگیری ظرفیت نگهداری آب در فیبر

جهت اندازه‌گیری ظرفیت نگهداری آب، ۳ گرم فیبر خشک شده با ۳۰ میلی لیتر آب مقطر درون لوله‌های سانتریفوژ در درجه حرارت اتاق مخلوط و پس از ۱۸ ساعت، نمونه‌ها با دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. فاز بالایی دور ریخته شده و فاز پایینی به یک صافی که از قبل وزن شده بود، منتقل گردید. پس از گذشت ۱۵ دقیقه، نمونه مرطوب به همراه صافی وزن شده و درون آون تحت خلا با دمای ۱۱۰ به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. سپس نمونه خشک شده به همراه صافی وزن شده و سپس ظرفیت نگهداری آب (رابطه ۴) در دوتکرار، ۲۴ ساعت پس از تولید محاسبه گردید (Maani *et al*., 2016).

ظرفیت نگهداری آب = (وزن نمونه مرطوب – وزن نمونه خشک) / وزن نمونه خشک. (۴)

آزمون‌های رئولوژی فیبر

آزمون‌های رئولوژی توسط دستگاه رئومتر (MCR ۳۰۱، پار فیزیکا اتریش) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود. در این آزمون از ۲ صفحه موازی زبر استفاده می‌گردد، قطر صفحه دستگاه ۲۵ میلی‌متر و فاصله ایجاد شده بین دو صفحه ۱ میلی‌متر در نظر گرفته می‌شود.

آزمون روبش کرنش، در کرنش متغیر ۰/۰۱–۱۰۰٪ و فرکانس ثابت HZ ۱، به‌منظور تعیین ناحیه ویسکوالاستیک خطی انجام می‌شود (حداکثر کرنشی که ماده می‌تواند تحمل کند اما تغییرات غیرقابل برگشت در ساختار آن به‌وجود نیاید). سپس آزمون روبش فرکانس در زیر منطقه ویسکوالاستیک خطی انجام خواهد شد. این آزمون در مقدار

1 Emulsifying activity index (EAI)

2 Emulsifying stability index (ESI)

کرنش ثابت و فرکانس متغیر HZ ۱۰۰-۰/۰۱ صورت می‌گیرد. از این آزمون فاکتورهای مدول ذخیره (G') و مدول افت (G") به‌عنوان تابعی از فرکانس، به‌دست می‌آید (Aslanzadeh *et al*., 2012).

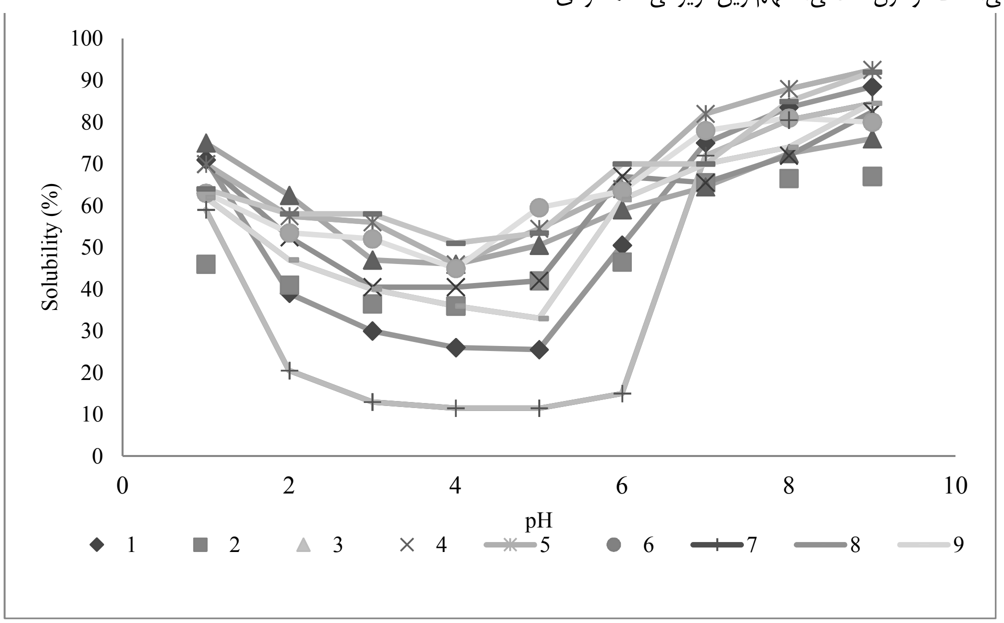
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به‌منظور طراحی تیمارها از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های مختلف با ۳ تکرار به‌صورت کاملا تصادفی، از نرم‌افزار مینی تب ۱۶ استفاده شد و تجزیه و تحلیل‌ها در سطح احتمال خطای ۰/۰۵ انجام گرفت. با استفاده از این نرم‌افزار ابتدا نرمال بودن نتایج بررسی شد. سپس اگر نتایج بر منحنی توزیع نرمال منطبق بودند، از آزمون پارامتری آنالیز واریانس ANOVA و در صورت عدم انطباق، آزمون غیرپارامتری کروسکال-والیس جهت بررسی تفاوت معنی‌دار بین داده استفاده گردید، بررسی معنادار بودن میانگین نتایج نمونه‌ها با یکدیگر نیز با استفاده از آزمون توکی انجام شد.

نتایج و بحث

آزمون حلالیت پروتئین استخراج شده از باقلا

حلالیت پروتئین به علت تاثیر بر ویژگی‌هایی مانند امولسیون‌کنندگی، کف و ژل‌کنندگی، مهم‌ترین ویژگی عملکردی پروتئین می‌باشد. بنابراین، حلالیت پروتئین می‌تواند بر ایجاد طعم، بافت و ارزش غذایی تاثیرگذار باشد (Du *et al*., 2017). به این جهت، تعیین حلالیت این پروتئین‌ها در pHهای بین ۲-۱۰ مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). به‌طور کلی، برای همه نمونه‌های پروتئین باقلا، بیشترین حلالیت در pH با محدوده ۲-۳ و ۷-۱۰ مشاهده شد. حلالیت اکثر نمونه‌ها، در pH ۴، ۵ و ۶ کمترین مقدار را نشان داد. مشاهدات مشابه مطالعات انجام شده بر روی کنسانتره پروتئین تولید شده نخود، نخودفرنگی و عدس با استفاده از تکنولوژی اولترافیلتراسیون و ایزوالکتریک (Boye *et al*., 2010)، پروتئین ماش (Du *et al*., 2017) و ایزوله پروتئین لوبیا و سویا (Tan *et al*., 2014) بود. در نقطه ایزوالکتریک، پروتئین به علت برابری بارهای مثبت و منفی در سطح مولکولی، در حالت خنثی الکتریکی قرار دارد. واکنش‌های هیدروفوبیکی بین پروتئین‌ها بسیار بزرگتر از نیروی دافعه هیدروفیل و هیدراتاسیون که توسط بار باقی مانده تولید شده، می‌باشد. بنابراین کمترین مقدار حلالیت و تجمع در نقطه ایزوالکتریک رخ می‌دهد (Constantinides & Adu-Amankwa, 1980; Eromosele *et al*., 2008). حلالیت نمونه‌هایی که تحت تاثیر اولتراسوند و هیدرولیز آنزیمی قرار گرفتند به‌طور معنی‌داری در مقایسه با نمونه بدون استفاده از اولتراسوند و هیدرولیز آنزیمی افزایش داشتند (p<۰/۰۵).



شکل ۱-حلالیت نمونه‌های پروتئین باقلا در pHهای ۲-۱۰

این نتایج با نتایج مطالعات قبلی که نشان دادند اولتراسوند موجب افزایش حلالیت پروتئین می‌شود مطابقت داشت و حلالیت پروتئین با افزایش شدت و زمان اولتراسوند، افزایش می‌یابد همچنین حلالیت با کاهش قدرت اولتراسوند و زمان کاهش یافت. Jiang و همکاران (۲۰۱۴) احتمال دادند، مولکول‌های پروتئین به‌طور جزئی در اثر اولتراسوند گسترش می‌یابند در واقع زنجیره پروتئینی شکسته شده و

ساختار سطحی بیشتری در دسترس قرار می‌گیرد و این باعث افزایش تعامل بین پروتئین‌ها و مولکول‌های آب می‌شود. ارزانی و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که اولتراسونیک می‌تواند اندازه ذرات را کاهش دهد و باعث افزایش تعاملات پروتئین و آب و در نتیجه افزایش حلالیت پروتئین شود.

اندازه‌گیری ظرفیت جذب روغن در پروتئین استخراج شده از باقلا

مکانیسم جذب روغن شامل اتصالات فیزیکی روغن با اجزا پروتئینی و میل ترکیبی زنجیره پروتئین‌های غیرقطبی برای اتصال با چربی می‌باشد (Kinsella, 1979). اتصال چربی در واقع توانایی پروتئین‌ها برای جذب و حفظ آب و چربی می‌باشد که این دو عامل از عوامل موثر در کیفیت بافت و ساختار ماده غذایی و مزه و طعم غذاها می‌باشد (Okezie & Bello, 1988). نتایج پژوهش (شکل ۲)، اختلاف معنی‌داری در سطح ۹۵ درصد بین نمونه‌های پروتئین باقلا از نظر جذب روغن نشان دادند به‌طوری که بیشترین میزان جذب روغن در نمونه FBP1 (توان و زمان اولتراسوند W ۳۰۰، ۳۵ و دوز آنزیم و مدت هیدرولیز، ۰/۱۵٪، ۲۵ دقیقه) به میزان ۴۱۵/۳۰٪ و کمترین جذب روغن در نمونه FBP4 (توان و زمان اولتراسوند W ۲۰۰ و ۱۵ دقیقه و دوز آنزیم و مدت هیدرولیز ۰/۱۵٪ و ۱۵ دقیقه) به میزان ۱۷۴/۴۰٪ اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد، استفاده از اولتراسوند و هیدرولیز آنزیمی تاثیر مثبتی در افزایش جذب روغن داشته است، در حالیکه Abdel-Aal و همکاران (۱۹۸۶) نشان دادند که ظرفیت جذب روغن در کنسانتره پروتئین استخراج شده به روش نقطه ایزوالکتریک در باقلا، ۷۶/۶٪ بوده است.

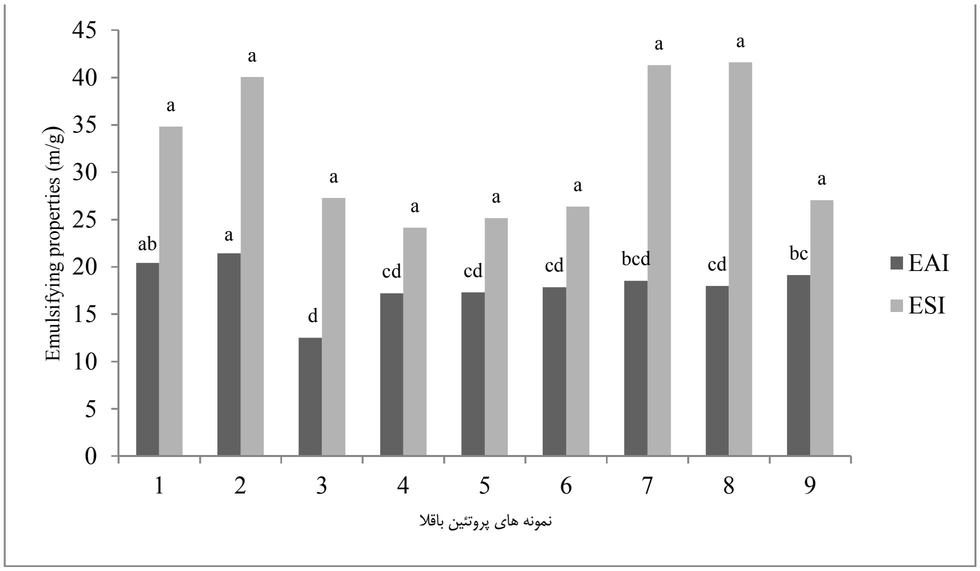


شکل۲- میزان ظرفیت جذب روغن در نمونه‌های پروتئین باقلا

امولسیون‌کنندگی پروتئین استخراج شده از باقلا

خاصیت امولسیفایری پروتئین باقلا به‌وسیله فعالیت امولسیفایری (EAI) و شاخص پایداری امولسیفایری (ESI) مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). EAI ظرفیت پروتئین را در جهت کمک به تشکیل امولسیون نشان می‌دهد در حالیکه ESI یک معیار سنجش برای تعیین توانایی پروتئین در ایجاد مقاومت ساختار امولسیونی در یک دوره زمانی مشخص را فراهم می‌کند (Liu *et at.*, 2008 و Okezie & Bello, 1988). نتایج نشان دادند، اختلاف معنی‌داری بین EAI تیمارهای پروتئین باقلا وجود دارد ($p<0.05$). میزان EAI تیمارهای پروتئین باقلا، بین ۱۲/۵۰ m^2/g برای تیمار FBP4 (کمترین) و ۲۱/۴۲ m^2/g برای تیمار FBP2 (بیشترین) به‌دست آمد. به‌طوریکه افزایش توان اولتراسوند و افزایش دوز مصرفی آلکالاز ۲/۴ باعث افزایش فعالیت امولسیفایری شد. شاخص پایداری امولسیفایری تیمارهای پروتئین باقلا اختلاف معنی‌داری، نشان نداد ($p>0.05$) و ESI تیمارها بین ۲۱/۴۳ min در تیمار FBP4 (کمترین) و ۴۱/۶۰ min در تیمار FBP8 (بیشترین) به‌دست آمد. حلالیت در تشکیل امولسیون نقش مهمی را ایفا می‌کند، پروتئین‌هایی که حلالیت کمتری دارند امولسیفایرهای خوبی نیستند و باعث لخته شدن امولسیون می‌شوند (Moure *et al,* 2006). افزایش حلالیت پروتئین باعث نفوذ سریعتر پروتئین به سطح مشترک بین دو فاز آب-روغن می‌شود و باعث فعالیت امولسیون‌کنندگی

پروتئین‌ها می‌شود (Singhe *et al.*, 2008). Amaral و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند، امولسیون‌های حاصل از پروتئین هیدرولیز شده لوبیا سیاه تحت درمان آنزیم آلکالاز بسیار پایدارتر از هیدرولیز با استفاده از پپسین بودند، زیرا امولسیون‌های تهیه شده با پروتئین‌های حاصل از هیرولیز پپسین دارای اندازه بزرگتری نسبت به امولسیون‌های تهیه شده از آلکالاز بودند. تشکیل ذرات کوچک در امولسیون‌هایی که با هیدرولیز آلکالاز تهیه می‌شود، ممکن است به علت آبگریزی بیشتر این هیدرولیز و در نتیجه تعامل بیشتر ذرات باشد. Kimura و همکاران (۲۰۰۸) خواص عملکردی پروتئین‌های بومی را از لوبیاهای مختلف مطالعه کردند، بهترین خواص امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون را در تشکیل قطرات کوچک در امولسیون یافتند. Yust و همکاران (۲۰۰۳) افزایش پایداری امولسیون‌های تهیه شده از پروتئین‌های هیدرولیز شده نخود توسط آلکالاز را گزارش دادند. Avramenko و همکاران (۲۰۱۳) بیان کردند، کاهش گروه‌های هیدروفوبیک در سطحی پروتئین عدس هیدرولیز شده توسط تریپسین با کاهش پایداری امولسیون همراه بود. Sikorski (۲۰۰۱) گزارش داد که خواص امولسیون پروتئین حبوبات به شدت تحت تاثیر اندازه مولکولی، گروه‌های هیدروفوبیک، بار شبکه و انعطاف‌پذیری مولکولی است با این حال در میان این ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، گروه‌های هیدروفوبیک و بار سطحی شبکه مهم‌ترین عوامل در این خواص عملکردی هستند.



شکل ۳-خصوصیات امولسیون‌کنندگی نمونه‌های پروتئین باقلا

پتانسیل زتا پروتئین استخراج شده از باقلا

به‌طور معمول، اگر اسیدهای آمینه حاضر با بار مثبت بیشتر از اسیدهای آمینه منفی باشد، پتانسیل زتا محلول پروتئینی مثبت است (Bouzid *et al.*, 2008). طبق جدول ۳، پتانسیل زتا تمام تیمارهای مورد بررسی، منفی بود، که نشان‌دهنده این است که، محلول تیمارهای پروتئین باقلا حاوی آمینواسیدهای با بار منفی بیشتری نسبت به اسیدهای آمینه با بار مثبت است. نتایج نشان دادند اگرچه قدر مطلق عددی پتانسیل زتا نمونه‌های تحت فراصوت، افزایش می‌یابد اما میزان بار منفی این پتانسیل در قدرت‌های متوسط و بالای فراصوت به شدت کاهش می‌یابد و نکته مهم در این خصوص این است که بار سطحی موثر ذرات پروتئینی میزان حلالیت، پراکندگی و تجمع وخصوصیات فعال سطحی آن‌ها را تعیین می‌کند (Song *et al.*, 2013). بنابر نتایج به‌دست آمده، اولتراسونیکاسیون در قدرت‌های متوسط و بالا و میزان آنزیم پروتئاز در دوزهای متوسط و زیاد ممکن است بار منفی سطحی پروتئین‌ها را افزایش دهند.

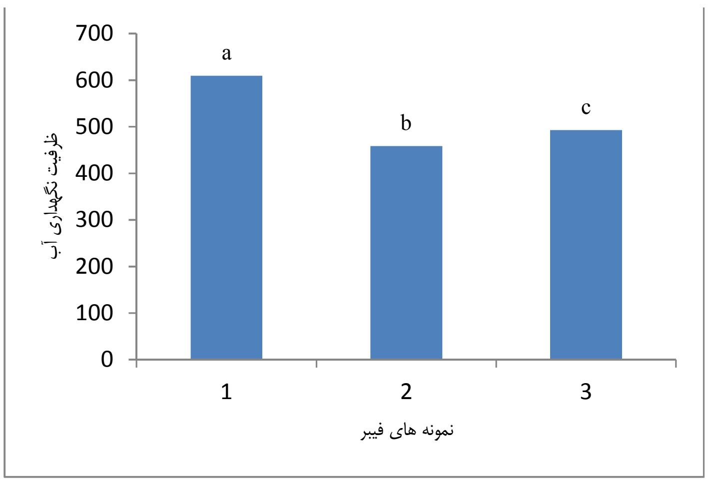
جدول ۳- میزان پتانسیل زتا پروتئین‌های استخراج شده از باقلا

نام نمونه	پتانسیل زتا
FBP1	−۱۶/۵۵± ۰/۹ [b]
FBP2	−۲۲/۸۰± ۰/۲ [d]
FBP3	−۲۳/۵۵± ۰/۶ [d]
FBP4	−۱۸/۱۵± ۰/۴ [b]
FBP5	−۲۱/۳۰±۰/۸ [cd]
FBP6	−۲۲/۳۵± ۰/۶ [d]
FBP7	−۱۷/۹۵±۰/۴ [b]
FBP8	−۱۸/۵۰±۰/۷ [b]
FBP9	−۱۸/۹۰± ۰/۸ [bc]

نتایج به‌دست آمده با مشاهدات Giang و همکاران (۲۰۱۴) بسیار نزدیک بود. آن‌ها بیان کردند که اولتراسونیکاسیون در قدرت متوسط موجب افزایش میزان بار سطحی منفی ایزوله پروتئینی لوبیا سیاه، تقویت نیروی دافعه الکترواستاتیک درون مولکولی، باز شدن لخته‌های پروتئین موجود، ممانعت از تجمع و لخته شدن بیشتر ذرات و بهبود پایداری دیسپرسیون‌های پروتئینی می‌شود که این پدیده منجر به افزایش حلالیت پروتئین می‌شود. در تحقیق حاضر میزان پتانسیل زتا پروتئین استخراج شده باقلا بدون تاثیر اولتراسوند و آنزیم ۱۱/۸۰- به‌دست آمد که از همه نمونه‌ها بیشتر بود در حالیکه Johnston و همکاران (۲۰۱۵)، میزان پتانسیل زتا ایزوله پروتئین باقلا که به روش قلیایی استخراج شده بود را ۴۶/۴- به‌دست آوردند. پروتئین‌ها دارای بار منفی در pH ۷ هستند، زیرا همه آن‌ها بالاتر از نقطه ایزوالکتریک خود هستند (که پتانسیل زتا صفر است). بار منفی خالص در pH ۷ به‌طور عمده از بار منفی گروه‌های R بر روی آمینو اسیدهای آسپارتات و گلوتامات در سطح پروتئین قرار دارد.

ظرفیت نگهداری آب در فیبر استخراج شده از باقلا

مطابق جدول ۴، میانگین ظرفیت نگهداری آب در نمونه فیبر با pH ۱۰ (FBF10) تفاوت معنی‌داری با دو نمونه دیگر (FBF11 و FBF12) نشان داد (p<۰/۰۵). به‌طوریکه تیمار FBF10 بیشترین میزان ظرفیت نگهداری آب را داشت. در حالی که معانی و همکاران (۲۰۱۶) بیشترین میزان ظرفیت نگهداری آب در فیبر برنج قهوه ای را در pH ۱۲/۵ یافتند. همچنین Aslanzadeh و همکاران (۲۰۱۲) بیشترین میزان WHC در سبوس گندم را در pH ۱۱/۵ یافتند و اظهار داشتند که تیمار سبوس گندم با پراکسید هیدروژن تحت شرایط قلیایی موجب افزایش ظرفیت نگهداری آب شده است. صالحی فر و فدایی نوغانی (۲۰۱۳)، راندمان استخراج در فیبر رژیمی تهیه شده از سبوس برنج به روش آنزیمی را بالا بیان کردند زیرا استفاده از آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز و آمیلوگلوکوزیداز ، نشاسته و پروتئین و سایر کربوهیدرات‌هایی که ناخالصی محسوب می‌گردند را جداسازی می‌کند و در نهایت میزان بیشتری فیبر حاصل می‌گردد.

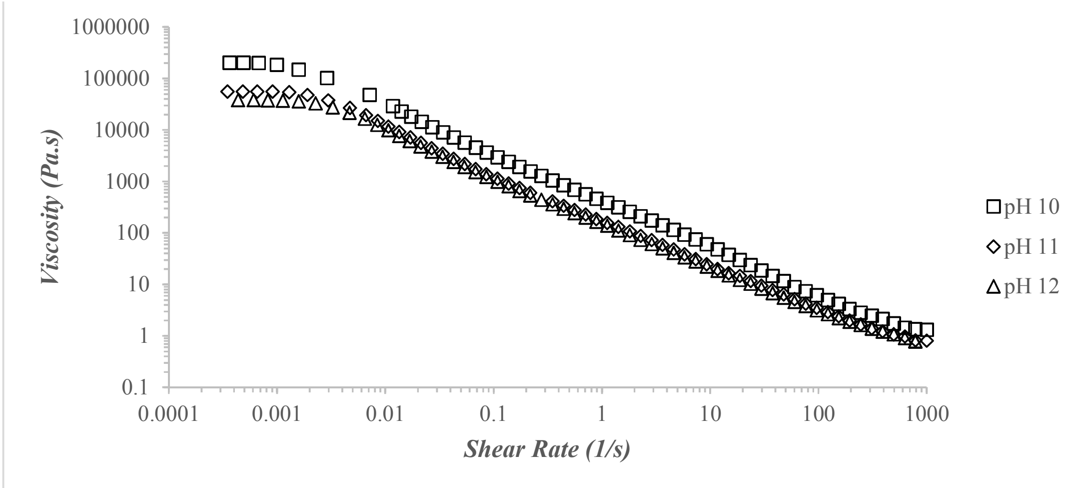


شکل ٤- ظرفیت نگهداری آب در نمونه‌های فیبر

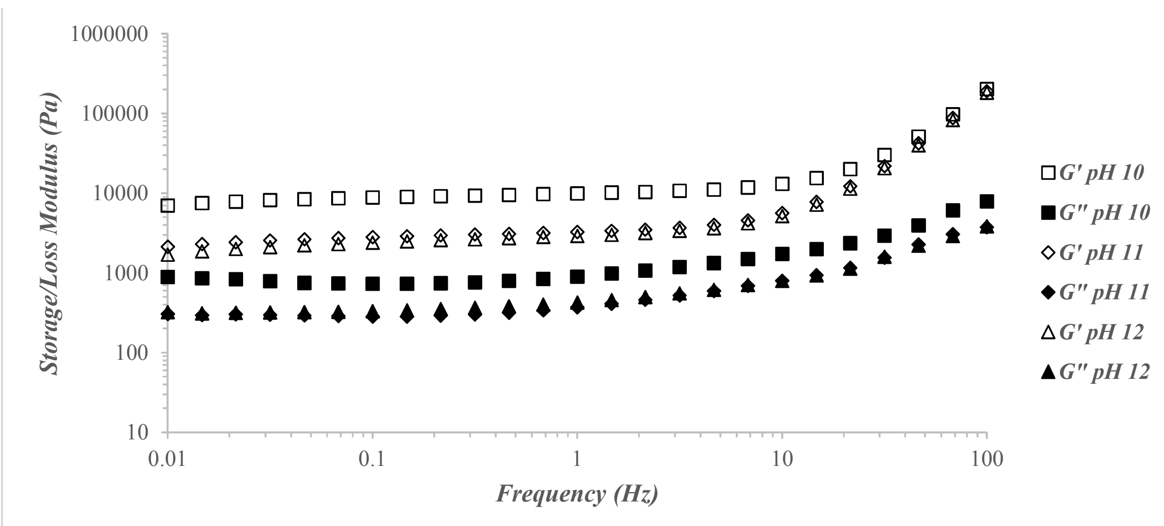
آزمون رئولوژی

شکل ۵، روند تغییرات ویسکوزیته ظاهری نسبت به سرعت برشی در نمونه‌ها را نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که در تمامی نمونه‌ها با افزایش سرعت برشی، ویسکوزیته کاهش می‌یابد و یک رفتار رقیق‌شونده با برش یا سودوپلاستیک در کلیه نمونه‌ها مشاهده می‌گردد. این رفتار نتیجه یک تخریب ساختاری شدید ناشی از اعمال برش در امولسیون‌های غلیظ بوده است. این نتایج مشابه مطالعات انجام شده توسط Feng و همکاران (۲۰۱۷) بود به طوری که آن‌ها نیز کاهش ویسکوزیته فیبر پوسته لوبیا سیاه را با افزایش سرعت برشی نشان دادند.

شکل ۶، روند تغییرات مدول ذخیره (G') و افت (G") با افزایش فرکانس از ۰/۰۱ تا ۱۰۰ هرتز و در کرنش ثابت ۰/۳٪ در نمونه‌های فیبر را نشان می‌دهد. بالاتر بودن G' از G" نشان‌دهنده غالب بودن ویژگی‌های جامد و الاستیک می‌باشد و وابسته بودن روند تغییرات مدول ذخیره و افت به فرکانس، نشان‌دهنده این است که ساختار ژل ضعیف است (Maani *et al.,* 2016 & Karim *et al.*, 2017). در همه نمونه‌های فیبر باقلا میزان G' از G" بالاتر بوده است به طوری که در نمونه FBF10 که دارای pH ۱۰ بالاترین سطح G' نسبت به دو نمونه دیگر مشاهده شد که نشان‌دهنده وجود ویژگی جامد و الاستیکی بیشتری نسبت به دو نمونه دیگر است و نیز با توجه به وابسته نبودن روند تغییرات مدول ذخیره و افت به فرکانس در کلیه نمونه‌ها، یک ساختار ژل قوی را از خود نشان دادند.



شکل ۵- روند تغییرات ویسکوزیته ظاهری نسبت به سرعت برشی در تیمارهای فیبر باقلا در pHهای ۱۰، ۱۱ و ۱۲



شکل ٦- تغییرات مدول ذخیره (G') و افت (G'') با افزایش فرکانس از ۰/۰۱ تا ۱۰۰ هرتز در تیمارهای فیبر در pHهای ۱۰، ۱۱ و ۱۲

نتیجه‌گیری

این مطالعه با هدف بهینه‌سازی استخراج و اصلاح ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین و فیبر باقلا انجام شد. استخراج پروتئین باقلا تحت شرایط تیمار با اولتراسوند همراه با هیدرولیز آنزیمی کنترل شده باعث بهبود خصوصیات عملکردی پروتئین باقلا شامل خصوصیات امولسیون کنندگی، حلالیت و روغن گردید. از آنجایی که این خواص به‌طور مستقیم بر بافت غذا و خواص حسی آن موثرند در نتیجه، از پروتئین باقلا می‌توان جهت توسعه مواد غذایی نوین با مشخصات تغذیه‌ای بهبود یافته استفاده کرد. همچنین، استخراج فیبر باقلا با محلول هیدروکسید سدیم با pH ۱۰ و پراکسید هیدروژن ۷٪ و هیدرولیز آنزیمی باعث بهبود قابل توجهی در ظرفیت نگه‌داری آب و ویژگی‌های رئولوژی فیبر باقلا شد.

منابع

اصلان‌زاده، م. میزانی، م. گرامی، ع. علیمی، م. ۱۳۹۰، بررسی عملکرد پراکسید هیدروژن بر روی ویژگی های فیزیکی فیبر رژیمی تولید شده از سبوس گندم، فصلنامه علوم غذایی و تغذیه، دوره ۹، شماره ۴، ۲۱–۲۸.

صالحی فر، م، فدایی نوغانی، و، ۱۳۹۲، بررسی قابلیت استخراج فیبر رژیمی از سبوس برنج و مقایسه خواص عملکردی آن با فیبر تجاری گندم، علوم غذایی و تغذیه، ۶۱، ۲۱–۳۰.

AACC (2000c). American association of cereal chemists. Approved method 56-30 (10th ed.). St. Paul, MN, USA.

Abdel-Aal, E. S. M., Shehata, A. A., El-Mahdy, A. R., & Youssef, M. M. (1986). Extractability and functional properties of some legume proteins isolated by three different methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37(6), 553-559.

Amani. M, M., Javanmard, A., Morshedloo, M. R., Maggi, F. (2017). Evaluation of yield, essential oil content and compositions of peppermint (Mentha piperita L.) intercropped with faba bean (*Vicia faba* L.). *Journal of Cleaner Production*, 167, ISSN 0959-6526.

Amaral. D. E, J., Levien. V, N., Zanella. P, V., De. B, J. J., Renato. G. D , A & Rosa. Z, E. D. (2017). Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: physicochemical and functional properties. *Food Chemistry*, 214, 460-467.

Arzeni, C., Martinez, K., Zema, P., Arias, A., Perez, O., & Pilosof, A. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 463–472.

Aslanzadeh, M., Mizani, M., Alimi, M & Gaeami, A. (2012). Rheological properties of low fat mayonnaise with different levels of modified wheat bran. *Food Biosciences and Technology*, 2, 27-34.

Avramenko, N. A., Low, N. A & Nickerson, M. T.(2013). The effects of limited enzymatic hydrolysis on the physicochemical and emulsifying properties of a lentil protein isolate. *Food Research International*, 51, 162-169.

Bouzid, H., Rabiller-Baudry, M., Paugam, L., Rousseau, F., Derriche, Z., & Bettahar, N. E. (2008). Impact of zeta potential and size of caseins as precursors of fouling deposit on limiting and critical fluxes in spiral ultrafiltration of modified skim milks. *Journal of Membrane Science*, 314(1), 67–75

Boye, J. I., Aksay, S., Roufik , S., Ribereau, S., Mondor, M., Farnworth, E & Rajamohamed, S.H. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43, 537-546.

Caliskanturk. K, S., Gunay, D & Sayar, S. (2017). In vitro evaluation of whole faba bean and its seed coat as a potential source of functional food components. *Food Chemistry*, 230,182-188.

Coda, R., Varis, J., Verni, M., G. Rizzello, C & Katina, K. (2017). Improvement of the protein quality of wheat bread through faba bean sourdough addition. *Food Science and Technology,* 82, 296-302.

Constantinides, A., & Adu-Amankwa, B. (1980). Enzymatic modification of vegetable protein: Mechanism, kinetics, and production of soluble and partially soluble protein in a batch reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 22(8), 1543-1565.

Chen, L., Chen, J., Ren, J., & Zhao, M. (2011). Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2600–2609.

Du, M., Xie, J., Gong, B., Xu, X., Tang, W., Li, X., Li, Ch., Xie, M. (2017). Extraction, physicochemical characteristics and function properties of mung bean protein. *Food Hydrocolloids*, 1-10.

Eromosele, C. O., Arogundade, L. A., Eromosele, I. C., & Ademuyiwa, O. (2008). Extractability of African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*) protein in acid, salt and alkaline aqueous media. *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1622-1628.

Feng, Z., Dou, W., Alaxi, S., Niu, Y & Yu, L. (2017). Modified soluble dietary fiber from black bean coats with its rheological and bile acid binding properties. *Food Hydrocolloids*, 62, 94-101.

Hendawey, M. H & Younes, A. M. A. (2013). Biochemical evaluation of some faba bean cultivars under rainfed conditions at El-Sheikh Zuwayid. *Annals of Agricultural Sciences*, 58, 183-193.

Janser. S. d. C, R., Granato. C, V & Harumi. S, H. (2017). Binary mixture of proteases increases the antioxidant properties of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein-derived peptides obtained by enzymatic hydrolysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10, 291-297.

Jiang, L., Wang, J., Li, Y., Wang, Zh., Liang, J., Wang, R., Chen, Y., Ma, W., Qi, W & Zhang, M. (2014). Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. *Food Research International*, 62, 595-601.

Johnston, S. P., Nickerson, M. T & Low, N. H. (2015). The physicochemical properties of legume protein isolates and their ability to stabilizer oil-in-water emulsions with and without genipin. *J Food Sci Technol*. 52(7), 4135-4145.

Karim, M., Alimi, M., Shokoohi, S & Fazeli, F. (2017). Effect of long-chain inulin and modified starch on the physicochemical and rheological properties of doogh (Iranian yogurt drink). *Acta Alimentaria*, 46 (1), 51–60.

Kinsella, J. E. (1979). Functional properties of soy proteins. Journal of the American Oil Chemists' *Society*, 56, 242–258.

Khosravi, Y., Keramat, J., Hoseini, E., Keshavarz. H, A. A & Mahmodi, E. (2013). Investigating the effect of pH and ionic concentration on foaming and emulsifing different Iranian beans. *Innovation in Science and Technolory*, 1, 99-111(in Persian).

Kimura, A., Fukuda, T., Zhang, M., Motoyama, S., Maruyama, N., & Utsumi, S. (2008). Comparison of physicochemical properties of 7S and 11S globulins from pea, fava bean, cowpea, and French bean with those of soybean-french bean 7S globulin exhibits excellent properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10273-10279.

Lin, M. J. Y., & Humbert, E. S. (1974). Certain functional properties of sunflower meal products. *Journal of Food Science*, 39(2), 368–370.

Lu, W., Chen, X. W., Wang, J. M., Yang, X. Q., Qi, J. R. (2015). Enzyme-Assisted Subcritical Water Extraction and Characterization of Soy Protein from Heat-Denatured Meal. J*ournal of Food Engineering*.

Maani, B., Alimi, M., Shokoohi, S & Fazeli, F.(2016). Substitution of modified starch with hydrogen peroxidemodified rice bran in salad dressing formulation: physicochemical, texture, rheological and sensory properties. Texture Studies, 48, 205-214.

Martinnez. M, D., Hernandez, B., Amigo, L., Miralles, B & AngelGomez, J.(2013). Extraction/Fractionation techniques for proteins and pepfies and protein digestion. *Food Microbiology and Food Safety* 2.

Martinez. V, A., Lobato. C, C., Hernandez. R, B. E., Roman. G, A., Alvarez. R, J., Vernon. C, E. J. (2018). High intensity ultrasound treatment of faba bean (*Vicia faba* L.) protein: Effect on surface properties, foaming ability and structural changes. Ultrasonics Sonochemistry, 44, 97-105.

Mu, L., Zhao, M., Yang, B., Zhao, H., Cui, C., & Zhao, Q. (2010). Effect of ultrasonic treatment
on the graft reaction between soy protein isolate and gum acacia and on the physicochemical properties of conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4494–4499.

Moure, A., J. Sineiro, J., Herminia Domınguez, H & Parajo, J.C. (2006). Functionality of oilseed protein products: A review. *J. Food Research International* 39, 945–963.

Multari, S., Stewart, D & Russell, W. R. (2015). Potential of Fava Bean as Future Protein Supply to Partially Replace Meat Intake in the Human Diet. Comprehensive *Reviews in Food Science and Food Safety,* 14, 511-522.

Nivala, O., Makinen, O. E., Kruus, K., Nordlund, E & Ercili. C, D. (2017). Structuring colloidal oat and faba bean protein particles via enzymatic modification. *Food Chemistry,* 231, 87-95.

Okezie , B. O., Bello, A. B. (1988). Physicochemical and functional properties of winged bean flour and isolate compared eith soy isolate. Food Sci, 53, 450-454.

Quemener, B. (1988).Improvements in the high pressure liquid chromatographic determination of amino sugars and α-galactosides in faba bean, lupin and pea. *Journal of Agriculture and food chemistry*, 36,754-759.

Rosa.S, N., Heinio, R. L., Cassan, D., Holopainen. M, U., Micard, V., Lantto, R & Sozer, N. (2016). Effect of bioprocessing and fractionation on the structural, textural and sensory properties of gluten-free faba bean pasta. *Food Science Technology*, 67, 27-36.

Rocıo, R., Jimenez, A., Fernandez. B, J., Guillen, R &, Heredia, A. (2006). Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. *Trends in Food Science & Technology,* 17, 3–15.

Singh, G., Wani, A.A,. Kaur,D, and Dalbir Singh Sogi, D. (2008). Characterization and functional properties of proteins of some Indian chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. *J Sci Food Agric* 88:778–786.

Sikorski, Z. E. (2001). Functional properties of proteins in food systems. In Z. E. Sikorski (Ed.), *Chemical and functional properties of food protein*s (pp. 113–135).

Song, X., Zhou, C., Fu, F., Chen, Z., & Wu, Q. (2013). Effect of high-pressure homogenization on particle size and film properties of soy protein isolate. *Industrial Crops and Products*, 43, 538–544

Tan, E. S., Ngoh, Y. Y & Gan, C. Y. (2014). A comparative study of physicochemical characteristics and functionalities of pinto bean protein isolate (PBPI) against the soybean protein isolate (SPI) after the extraction optimization. *Food Chemistry*, 152, 447-455.

Tirgar, M., Silcock, P., Carne, A & Birch, E.J. (2017). Effect of extraction method on functional properties of flaxseed protein concentrates. *Food Chemistry*, 215, 417-424.

Tiwari, U & Cummins, E. (2011).Functinal and physicochemical properties of legume fiber. Pula Foods, Processing, *Quality and Nutraceutical Applications*, 121-156.

Yust, M. M., Pedroche, J., Giro´ n-Calle, J., Alaiz, M., Milla´ n, F., & Vioque, J. 2003. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alkalase. *Food Chemistry*, 81, 363–369.

Zee, J. A., Boudreau, A., Bourgeois, M. and Breton, R. (1988). Chemical composition and nutritional quality of faba bean (*Vicia faba L.Min*or) based tofu. *Journal of Food Science,* 53(6), 1772-1774, 1781.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 16, No. 5, Dec- Jan 2021, p. 569-580

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۶، شماره ۵، آذر- دی ۱۳۹۹، ص.۵۸۰-۵۶۹

Optimization of the extraction and modification of physicochemical properties of protein and fiber in ViciaFaba by ultrasound and enzymatic hydrolysis

M. Ouraji, M. Alimi, A. Motamedzadegan, Sh. Shokoohi

Received: 2019.06.30
Accepted: 2019.12.17

Introduction: In recent years, legumes have been highly considered as a good source of protein, fibers, minerals and other bioactive compounds in order to develop novel foods with improved nutritional properties. There is some evidence that legume consumption reduces the risk of diabetes, cardiovascular disease and some cancers. Vicia faba has about twice protein content as cereals and can be a good alternative to meat and protein-rich ingredients. It should also be noted that the amount of insoluble fiber is higher than soluble fibers in legume. Vicia faba belongs to the Fabaceae family .Vicia faba contains high protein (21-41% dry content of the bean), carbohydrates (51-68% dry content of the bean), fiber (5-5.8%), B-vitamins and minerals. Recently, the protein function of Vicia faba, especially its protein isolate, has been studied on a laboratory scale for use in food products, due to its good ability in hydration, solubility, emulsification, viscosity, and foam and gel formation. Research has also shown that the protein in Vicia faba has better ability to emulsify water and oil and foaming capacity and foam stability compared to bean and pea flour. The structural and functional properties of the protein isolates and concentrates of legumes such as Vicia faba are strongly influenced by their preparation, extraction and drying methods. One of the ways to improve extraction and optimization of protein properties can be ultrasound and an enzymatic controlled hydrolysis. Due to the importance of dietary fiber, various methods have been developed for their decomposition, many of which are very precise and special, some of which have high-purity enzymes and selectively release oligosaccharides and polysaccharides containing dietary fiber. In this study, the possibility of using ultrasound and limited enzymatic hydrolysis in order to produce value added product and increase the extraction efficiency and improve the functional properties of protein and fiber of Vicia faba, were evaluated.

Materials and Methods: In this study, ultrasound and enzymatic hydrolysis were used to optimize extraction and modify physicochemical properties of protein and fiber of VaciaFaba. The proteins were affected by ultrasound at 200, 300 and 400 W for 15, 25 and 35 minutes, and the *Alcalase* enzyme 2.4 LFG at 0.15, 0.3 and 0.45% doses were extracted at 15, 25 and 35 minutes and the design of the treatments was done by Designer Express software. Solubility, oil absorption capacity, emulsification and zeta potential of protein samples were measured. Vicia faba fiber extraction under alkaline conditions was obtained from solutions of 0.0012, 0.012 and 0.12% sodium hydroxide until reaching pH 12, 11 and 10 and Termamy 2x enzyme was used for enzyme hydrolysis. Water retention capacity and rheological properties of Vicia Faba fiber samples were investigated.

Results and Discussion: The results showed that the use of ultrasound and enzymatic hydrolysis had a positive effect on solubility, oil absorption capacity and emulsion properties of the protein samples. Zeta potential was also negative for all treatments, which indicates that the Vicia faba protein treatment solution contains more negative amino acids than positive-loaded amino acids. Among the fiber samples of the ViciaFaba, a fiber sample with a pH of 10 had the highest water retention capacity and G-level than the other two samples, indicating a more solid and elastic quality. Also, in all fiber samples, increasing cutting speed reduced the viscosity and the samples showed a dilution action with cutting or pseudoplastic.

Keywords: Viciafaba, extraction, protein, fiber.